

Eine neue fluorometrische Methode zur Aldosteron-Bestimmung im Harn

Von E. NOWOTNY¹⁾ und HJ. STAUDINGER

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. HJ. Staudinger)

(Eingegangen am 16. November 1965)

Es wird eine neue Methode für die Bestimmung von Aldosteron im menschlichen Harn beschrieben. Durch die empfindliche Nachweisreaktion auf Lithiumhydroxyd benötigt man nur $\frac{1}{10}$ Volumen Tagesharn. Die Methode ist genügend richtig, genau und spezifisch und wegen ihrer Einfachheit als Routineverfahren geeignet. Die Ergebnisse bei 20 Normalpersonen und bei Patienten wurden mitgeteilt und mit den Ergebnissen anderer Autoren verglichen.

A new method is reported for the determination of aldosterone in human urine. Only $\frac{1}{10}$ of the daily urine volume is required for the sensitive test reaction on lithium hydroxide. The accuracy and specificity of the method are satisfactory and, owing to its simplicity, it is suitable as a routine procedure. The results are given for 50 normal people and for patients and compared with the results of other authors.

Es gibt eine Reihe von Methoden zur Aldosteron-Bestimmung, die sich gut bewährt haben, da sie spezifisch und empfindlich sind. Sie sind aber mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden (1–16). Daher entschlossen wir uns, in Anlehnung an eine in unserem Institut früher ausgearbeitete Methode (17), eine einfache Aldosteron-Bestimmung für den Routinegebrauch zu entwickeln. Die Bestimmung ist mit $\frac{1}{10}$ Vol. des 24-Stdn.-Harns möglich; sie ist dabei einfacher als andere mit kleinen Harnvolumen arbeitende chemische Methoden (GERDES und STAIB [16], KLIMAN und Mitarbeiter [7]). Nach einer Vorreinigung an einer Kieselgelsäule wird das Steroidgemisch durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie getrennt (17). Für den quantitativen Nachweis benutzen wir die Fluoreszenzmessung auf Lithiumhydroxyd-Preßlingen (18). Aldosteron gibt wie andere Δ^4 -3-Ketosteroide auf der Oberfläche eines Lithiumhydroxyd-Preßlings eine empfindliche und für diese Steroide spezifische Fluoreszenz (19). Die Spezifität, die Genauigkeit und die Richtigkeit der im folgenden genau beschriebenen Methode sind für den klinischen Gebrauch ausreichend.

Methodik

Reagenzien

Chloroform: 2 l Chloroform werden 5 Min. mit 200 ml 0,1-proz. Kaliumpermanganat-Lösg. geschüttelt und dreimal mit Wasser gewaschen. Nach 24-stdg. Trocknen über wasserfreiem Kaliumcarbonat wird im Dunkeln über eine Kolonne destilliert. Für die Chromatographie wird Chloroform der Qualität „Uvasol“ (Fa. Merck) verwendet.

Methylenchlorid: wird wie Chloroform gereinigt.

Aceton: „Uvasol“ (Fa. Merck).

Acetatpuffer pH 4,5: 3,8 g wasserfreies Natriumacetat und 2,5 ml Essigsäure werden mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Äthanol: abs., p. a. (Fa. Riedel-de Haën) wird über eine Raschig-Kolonne einmal fraktioniert.

Methanol: p. a. (Fa. Riedel-de Haën) wird wie Äthanol gereinigt.

Kieselgel: unter 0,08 mm „Merck“ für Säulenchromatographie.

Kieselgel: HF₂₅₄ „Merck“ für Dünnschichtchromatographie. Die verwendeten Glasgeräte werden zunächst mit einer 2-proz. wäßr. Lösung von „RBS 25“ (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) und dann mit Chromschwefelsäure gereinigt.

Extraktion des Harns

Falls der Harn nicht frisch untersucht werden kann, wird er bei -20° eingefroren. Alle folgenden Arbeitsgänge sind grundsätz-

lich in diffusum Tageslicht bzw. bei gedämpftem künstlichem Licht durchzuführen, da sonst beträchtliche Aldosteronverluste eintreten können. Ein Zehntel der Tagesharnmenge wird mit konz. Salzsäure auf pH 1 eingestellt, 2 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen und dann mit Natriumchlorid gesättigt. Dann schüttelt man viermal je 5 Min. (evtl. mit einer Schüttelmaschine) mit Methylenchlorid aus (einmal mit $\frac{1}{3}$, dreimal mit je $\frac{1}{4}$ des eingesetzten Harnvolumens). Die Methylenchloridlösung wird danach durch Zentrifugieren geklärt. Je nach der mit Methylenchlorid extrahierten Menge Harnpigmente wäscht man die vereinigten Methylenchloridextrakte ein- oder zweimal mit $\frac{1}{4}$ Volumen 0,5N NaOH und zweimal mit $\frac{1}{4}$ Volumen Wasser. Die vereinigten Waschflüssigkeiten werden mit 30 ml Methylenchlorid nachextrahiert. Die vereinigten Methylenchloridlösungen dampft man nach Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat bei 35° im Vakuum in einem Rotationsverdampfer ein; durch die Kapillare leitet man einen schwachen Stickstoffstrom. Alle im folgenden erwähnten Destillationen werden in der gleichen Weise durchgeführt. (Bei stark lipoidhaltigem Harn [Nephrose] ist es nötig, den Verdampfungsrückstand in 5 ml Aceton aufzunehmen, zu filtrieren und die Lösung erneut einzudampfen; bei normalen Harnen kann dieser Schritt entfallen.) Der Rückstand wird nacheinander mit 5 ml und zweimal mit je 2,5 ml Acetatpuffer pH 4,5 versetzt und mit einem Glasstab gut durchgearbeitet, um das Aldosteron vollständig aus dem „fetten“ Verdampfungsrückstand zu lösen. Die vereinigten wäßr. Lösungen extrahiert man zweimal mit je 30 ml Methylenchlorid, trocknet über wasserfreiem Natriumsulfat und verdampft das Lösungsmittel.

Säulenchromatographische Vorreinigung

Wir arbeiteten in Anlehnung an das Verfahren von NEHER und WETTSTEIN (1).

Man gibt in ein Chromatographierohr ($32 \times 1,6$ cm), das unten mit einem Wattestopfen verschlossen ist, eine Aufschlammung von 1 g Kieselgel in Chloroform. Wenn das Chloroform fast durchgesickert ist, bringt man den Verdampfungsrückstand des Methylenchlorid-Extraktes quantitativ mit dreimal je 1 ml Chloroform auf die Säule, eluiert mit 40 ml Chloroform/Aceton (99:1) die störenden Pigmente und mit 70 ml Chloroform/Aceton (50:50) und danach mit 10 ml Äthanol die Steroide. Das steroidhaltige Eluat engt man ein, den Rückstand überführt man quantitativ mit Chloroform in ein Spitzröhrchen und dampft die Lösung ein.

Dünnschichtchromatographie

Sie erfolgte in Anlehnung an NISHIKAZE und STAUDINGER (17). Die Glasplatten (20×20 cm) werden mit Kieselgel HF₂₅₄ (25 g in 71 ml Wasser für 5 Platten, Schichtdicke 200 μ) beschichtet, 15 Min. an der Luft und über Nacht bei 100° getrocknet. Dann bewahrt man sie in einem Exsikkator über Blaugel auf. Den Startpunkt markiert man 3 cm von der linken und 2,5 cm von der unteren Plattenkante entfernt. Die Laufstrecke beträgt nach beiden Richtungen 15 cm.

Der Rückstand im Spitzröhrchen wird in 0,1 ml Chloroform aufgenommen und quantitativ unter Ausschluß des Tageslichtes

¹⁾ Stipendiat der Alexander-von-Humboldt-Stiftung.

punktförmig auf den Startpunkt der Platte aufgetragen. Das Röhrchen spült man noch zweimal mit je 0,1 ml/ Chloroform aus und trägt auch diese Lösungen auf die Platte auf. Zum Schluß trägt man noch je 10 µg der Leitsteroiden (17) auf den gleichen Fleck auf und chromatographiert zweidimensional im Dunkeln (1. Cyclohexan/Isopropanol [7:3]; 2. Chloroform/Eisessig [8:2]).

Der Aldosteronfleck wird mit Hilfe der Leitsteroiden im kurzwelligen UV-Licht (254 mµ) lokalisiert, von der Platte gekratzt und mit 2 ml/ Methanol eluiert. Nach Zentrifugieren pipettiert man 1,5 ml/ Überstand in ein Spitzröhrchen, versetzt den Rückstand mit weiteren 2 ml/ Methanol, zentrifugiert und überführt weitere 1,5 ml/ in das Schliff Röhrchen. Der Rückstand wird nochmal mit 2 ml/ Methanol versetzt. Nach Abzentrifugieren entnimmt man 2 ml/ und vereinigt sie mit den anderen Eluaten. Man verdampft einen aliquoten Teil dieser Lösung (0,1–0,3 ml, je nach Aldosteron Gehalt) für die Fluoreszenzreaktion. Zur Ermittlung des Plattenleerwertes kratzt man einen gleichgroßen Fleck von einer Stelle der gleichen Platte, die im UV-Licht (254 mµ) keine Absorption gibt, eluiert das Kieselgel in gleicher Weise mit Methanol und verdampft das gleiche Volumen des methanolischen Eluates wie beim Hauptwert.

Quantitative Bestimmung

Hauptwert (H): Man löst den Verdampfungsrückstand, der das Aldosteron enthält, in 0,1 ml/ reinstem Chloroform auf, engt die Lösung im Stickstoffstrom bei Raumtemperatur auf etwa 0,01 ml/ ein und trägt diese Lösung, wie bereits von uns beschrieben (18), auf einen Lithiumhydroxyd-Preßling auf. Das Spitzröhrchen wird noch zweimal mit je 0,1 ml/ Chloroform ausgespült, und die Spüllösungen werden nach Einengen auf 0,01 ml/ auf den gleichen Preßling aufgetragen.

Standardwert (S): Als Vergleich werden 0,1 µg in Chloroform gelöstes Aldosteron eingedampft, in reinstem Chloroform aufgenommen und unter den gleichen Bedingungen wie beim Hauptwert aufgetragen.

Leerwert (L): Die gleiche Menge Methanol wie beim Hauptwert wird im Spitzröhrchen im Stickstoffstrom verdampft und der Rückstand in gleicher Weise wie beim Hauptwert in Chloroform aufgenommen und auf einen Preßling aufgetragen.

Plattenleerwert (P): Der Verdampfungsrückstand des Eluates wird mit der gleichen Menge Chloroform wie beim Hauptwert behandelt und die Lösungen werden auf einen Preßling aufgetragen.

Es ist zu beachten, daß auf alle 4 Preßlinge das gleiche Volumen Chloroform in der gleichen Zeit aufgetragen wird. Ferner wird empfohlen, von H, S, L und P jeweils Doppelwerte auf zwei Preßlingen anzufertigen. Vor dem Auftragen der Lösungen muß man die Preßlinge fluorometrisch auf Verunreinigungen prüfen und nur Preßlinge mit annähernd gleicher, niedriger Grundfluoreszenz aussuchen¹⁾. Nach dem Auftragen der Chloroformlösungen werden die Tabletten fluorometrisch gemessen. Dann werden sie 20 Min. auf 100° erwärmt und nach Abkühlen erneut gemessen. Das Vorgehen und die Meßanordnung sind in unserer früheren Arbeit (18) genau beschrieben. Auch die hochgereinigten Lösungsmittel und die anderen verwendeten Chemikalien enthalten stets eine kleine Menge fluoreszierender Begleitstoffe, die mitgeschleift werden; deshalb sind die verschiedenen Korrekturen nötig. Die Fluoreszenzintensitäten der Preßlinge, auf die der Hauptwert (H) und der Plattenleerwert (P) aufgetragen werden, werden *vor* und *nach* dem Erhitzen gemessen. Die wahre Intensität der Fluoreszenz des Harnaldosterons (Ald) ergibt sich aus folgender Rechnung:

$$F_{H \text{ kor.}} = F_H(\text{nach}) - F_H(\text{vor}) \quad F = \text{relative Intensität der Fluoreszenz}$$

$$F_{P \text{ kor.}} = F_P(\text{nach}) - F_P(\text{vor}) \quad (\text{vor}) = \text{vor dem Erhitzen des Preßlings}$$

$$F_{\text{Ald}} = F_{H \text{ kor.}} - F_{P \text{ kor.}} \quad (\text{nach}) = \text{nach dem Erhitzen des Preßlings}$$

H = Hauptwert

P = Plattenleerwert

Ald = Aldosteron

Der Fluoreszenzwert für den Aldosteron-Standard (S) muß in folgender Weise korrigiert werden:

$$F_{S \text{ kor.}} = F_S(\text{nach}) - F_S(\text{vor}) \quad S = \text{Aldosteron-Standard}$$

Ergebnisse

Spezifität der Methode

Dünnschichtchromatographie

Wie NISHIKAZE und STAUDINGER (17) zeigen konnten, wandert Aldosteron bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie (1. Cyclohexan/Isopropanol [7:3]; 2. Chloroform/Eisessig [8:2]) stets im gleichen Verhältnis zu 11-Dehydrocorticosteron (A) und 11-Desoxycortisol (S). Bei dieser zweidimensionalen Chromatographie erscheint das Aldosteron aus Harnextrakten als einheitlicher Fleck. Um seine Reinheit und Identität mit authentischem Aldosteron zu prüfen, haben wir diesen Aldosteronfleck ausgekratzt und in den Systemen Äthanol (95%)/Chloroform (8:92) und Methylenchlorid/Eisessig/Methanol (90:10:5) erneut zweidimensional rechromatographiert. Der Fleck erschien erneut einheitlich und rund, was dafür spricht, daß das Aldosteron bereits nach der ersten zweidimensionalen Chromatographie sauber von anderen Steroiden und Verunreinigungen abgetrennt worden ist. Die R_F -Werte des aus Harn isolierten Aldosterons stimmen auch in diesem System mit denen von reinem Aldosteron überein.

Fluoreszenz- und Absorptionsspektren der Schwefelsäurechromogene

Wie ABRAHAM und STAUDINGER zeigten (20), geben die Corticosteroide beim Erhitzen mit konz. Schwefelsäure Fluoreszenzspektren mit jeweils spezifischen Maxima. Diese Eigenschaft haben wir zur Beurteilung der Einheitlichkeit des aus dem Harn gewonnenen Aldosterons herangezogen. Der nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie isolierte Aldosteronfleck wurde ausgekratzt und das Fluoreszenzspektrum der Schwefelsäurechromogene gemessen. Bei drei so untersuchten Harnen (Mischharnen von verschiedenen Personen) war das Fluoreszenzspektrum identisch mit dem Spektrum von reinem Aldosteron, das zuvor im gleichen System chromatographiert wurde. Auch dieser Befund zeigt, daß das aus dem Harn isolierte Aldosteron weitgehend rein und mit authentischem Aldosteron identisch ist. Das Maximum des Fluoreszenzspektrums von reinem Aldosteron, das in dem angegebenen System chromatographiert wurde, weicht gegenüber reinem „nicht chromatographiertem“ Aldosteron etwas ab (525 mµ gegenüber 545 mµ). Auch das Absorptionsmaximum der Schwefelsäurechromogene von Harnaldosteron ist mit dem von authentischem Aldosteron identisch. Selbst wenn das durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie aus dem Harn isolierte Aldosteron noch nicht ganz rein sein sollte, wird die Spezifität der Methode nicht betroffen, da der anschließende Nachweis des Aldosterons, die Fluoreszenz auf der Lithiumhydroxyd-Oberfläche, spezifisch für Δ^4 -3-Ketosteroide ist. Keines der bekannten Δ^4 -3-Ketosteroide wandert aber bei der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie zusammen mit

¹⁾ Es ist zweckmäßig, sich einen größeren Vorrat ausgesuchter Preßlinge anzufertigen.

Aldosteron. Die Spezifität dieser Methode beruht also auf dem angegebenen Trennverfahren *und* auf der für Δ^4 -3-Ketosteroide spezifischen und sehr empfindlichen Fluoreszenzreaktion auf Lithiumhydroxyd-Preßlingen.

Richtigkeit (Wiederfindung)

Zur Prüfung der Richtigkeit („accuracy“) der Methode wurde die Wiederfindung („recovery“) der einzelnen Schritte der Methode nach Zugabe verschiedener Mengen von Aldosteron geprüft:

Kieselgelsäule: Es wurden 1 μg und 5 μg Aldosteron auf die Säule gegeben. Die Wiederfindung war für beide Konzentrationen bei je 5 Bestimmungen durchschnittlich 91%.

Dünnschichtchromatographie: Es wurden 1 μg , 3 μg und 5 μg Aldosteron auf Dünnschichtplatten aufgetragen und zweidimensional chromatographiert. Die durchschnittliche Wiederfindung bei 12 Versuchen betrug für die drei angegebenen Konzentrationen 97%.

Gesamtmethode: Es wurden Mengen von 1 μg und 5 μg Aldosteron einem zuvor analysierten Harn zugesetzt. Die Wiederfindung ist in Tabelle 1 angegeben.

Genauigkeit

Zur Ermittlung der Genauigkeit („precision“) untersuchten wir die Streuung des Einzelwertes, indem wir den gleichen Mischharn 7 mal analysierten. Dabei wurde ein Durchschnittswert von 20,6 $\mu\text{g}/1000 \text{ ml}$ mit einer Standardabweichung S von $\pm 2,27 \mu\text{g}$ ($\pm 11\%$) erhalten (Tab. 2).

Anwendung der Methode

Normaler Harn

Durchschnittswerte (Normalwerte)

Die Ergebnisse der Bestimmungen an 20 Normalpersonen beiden Geschlechtes im Alter von 18 bis 69 Jahren sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Normalausscheidung für die Gesamtpopulation ($\bar{x} \pm 2s$) liegt demnach zwischen 2 und 23 μg pro Tag. Die mittlere Ausscheidung beträgt $12,4 \pm 5 \mu\text{g}$ mit einer Schwankungsbreite in unserem Kollektiv von 3,65 und 20,6 μg . Da es zwischen der Gruppe der Männer und der der Frauen keinen signifikanten Unterschied gibt, eine Feststellung, die auch andere Autoren gemacht haben (8, 13, 15), haben wir sie für die Bestimmung der Normalwerte zusammengefaßt.

Verlaufskurven (Individualschwankung)

Die Aldosteronausscheidung wurde bei einer normalen männlichen (36 J.) und einer normalen weiblichen Person (40 J.) über einen Monat verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 gezeigt. Daraus wird ersichtlich, daß bei der männlichen Versuchsperson die ausgeschiedenen Aldosteronmengen konstant sind ($\pm 34\%$ Abweichung vom Mittelwert). Die Aldosteronausscheidung bei der Frau hängt offenbar mit dem weiblichen Zyklus zusammen. Nach der Menstruation sind die Aldosteronwerte im Harn normal, in der Mitte des Zyklus fallen sie ab, in der zweiten Hälfte steigen sie an und erreichen ver-

Tab. 1
Richtigkeit der Methode
Ergebnis von Wiederfindungsversuchen mit verschiedenen dem Harnextrakt zugegebenen Aldosteron-Mengen

Aldosteron zugesetzt μg	wiedergef. μg	Prozentuale Wiederfindung bei Zusatz von	
		1 μg	5 μg
1	0,6	60	—
1	0,8	80	—
1	1,0	100	—
5	3,1	—	62
5	3,8	—	76
5	4,8	—	96
5	3,3	—	66
5	4,6	—	92
5	4,6	—	92
Durchschnitt:		80%	80%

Tab. 2
Genauigkeit der Methode
Mehrfachbestimmung bei einem Mischharn

Aldosteronkonzentration im Harn $\mu\text{g}/1000 \text{ ml}$
20,0
21,8
18,1
21,8
21,8
23,8
16,9
Durchschnitt \bar{x} : 20,6
$s : \pm 2,3$

Tab. 3
Ergebnisse der Aldosteronbestimmungen im Harn von gesunden Personen beiden Geschlechtes im Alter von 18 bis 69 Jahren

Name	Geschlecht	Alter	Tagesharn m/	Aldosteron μg
K. Be.	männlich	30	1490	11,6
E. N.	„	35	980	5,7
F. B.	„	27	747	7,6
W. W.	„	30	1156	12,7
K. Ben.	„	28	1325	20,6
W. F.	„	19	660	6,7
A. Br.	„	20	670	3,7
F. K.	„	29	1330	17,1
K. S.	„	19	930	17,5
W. G.	„	33	990	15,9
E. Ba.	weiblich	40	1230	8,0
A. N.	„	26	740	8,8
M. B.	„	26	1064	14,3
W. S.	„	50	1048	14,4
U. J.	„	20	1150	18,2
M. H.	„	22	1330	10,3
K. D.	„	44	1080	14,5
K. H.	„	69	940	20,3
F.	„	21	870	5,7
Jo.	„	23	410	14,8
Durchschnitt				\bar{x} : 12,4
				s : $\pm 5,1$
Normalwerte				$\bar{x} \pm 2s$: 2—23 μg

mutlich vor Anfang der Menses den höchsten Wert, der deutlich über der oberen Normalgrenze liegt. Die angegebenen Werte sind Doppelbestimmungen. — Gleichzeitig mit den erhöhten Aldosteronwerten wurde eine Neigung zur Wasserretention beobachtet. Interessant ist auch die Feststellung, daß ein Anstieg der Aldosteronausscheidung im Harn mit einer Erhöhung der Progesteronkonzentration einhergeht (luteotrophische Phase). Außerdem ist erwiesen, daß das Aldosteron genau wie das Progesteron während der Schwangerschaft vermehrt gebildet wird und dann nach der Geburt wieder absinkt. Dies deutet auf eine Interrelation dieser beiden Hormone hin (21, 22).

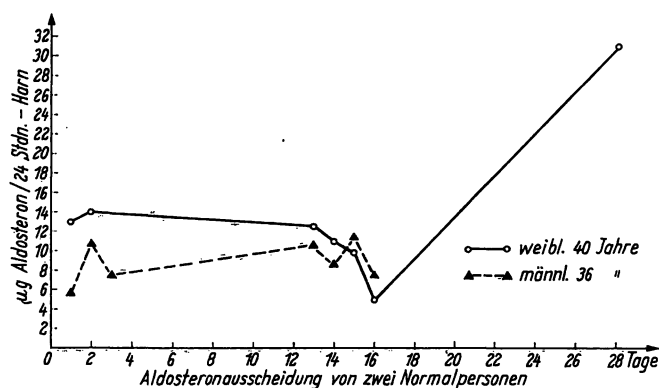


Abb. 1

Tab. 4
Ergebnisse der Aldosteronbestimmungen von 6 pathologischen Harnen und einem Schwangerschaftsharn

Name	Alter	Harnmenge ml/24 Stdn.	Aldosteron µg/24 Stdn.	Klinische Diagnose
E. S.	40	625	40	Cyclischer Hyperaldosteronismus
K. H.	16	650	17	Conn-Syndrom
G. T.	45	880	36	Dekompensiertes Herzvitium
L. S.	61	1500	49	Lebercirrhose
I. M.	46	650	4	Addison
W. H.	59	1400	26	Cushing
B. S.	20	1147	31	Schwangerschaft (3. Monat)

Tab. 5
Normalwerte, Schwankungsbreite und Wiederfindungsversuche von Aldosteron im Harn bei verschiedenen Autoren

Autor	Zahl der Personen	Geschlecht	µg Aldosteron/24-Stdn.-Harn Mittelwert	Schwankungs- breite	Wieder- findung %
NEHER, WETTSTEIN (1956)	—	—	(4,5)	1,0—9,0	75
MOOLENAAR (1957)	9	männl.	8,0	5,0—13,0	—
	12	weibl.	4,5	2,0—8,0	—
AYRES (1957)	31	männl.	11,0	4,6—23,5	77
NOWACZYNSKI (1957)	9	—	5,1	2,2—10,0	83
HERNANDO (1957)	17	—	5,0	0,0—15,0	20—31
BAULIEU, DE VIGAN (1958)	—	—	3,0	1,0—6,0	75
ROMANI (1958)	5	—	—	2,2—10,4	—
DYRENFURTH, VENNING (1959)	5	männl.	—	1,4—9,1	60
	7	weibl.	—	1,1—7,0	—
BROOKS (1960)	4	—	5,6	4,8—6,3	70
KLIMAN, PETERSON (1960)	26	—	10,0	5,0—19,0	105
BROMBACHER, HARTING (1961)	5	männl.	—	6,3—11,0	—
	4	weibl.	—	7,6—9,8	—
NISHIKAZE, STAUDINGER (1962)	—	—	10,0	—	—
GERDES, STAIB (1965)	10	—	8,8	3,6—17,8	70
NOWOTNY, STAUDINGER (1965)	20	—	12,4	3,0—20,0	80
STAIB (1961)	30	—	—	3,0—16,0	80
SIEGENTHALER (1962)	6	männl.	9	4,0—16,0	74
	4	weibl.	13	7,0—15,0	—

Pathologischer Harn

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse von 6 pathologischen und einem Schwangeren-Harn zusammengefaßt; sie stimmen mit denen von anderen Autoren (21, 23) gut überein. Die Werte, die wir bei einem klinisch diagnostizierten Fall von Conn-Syndrom gefunden haben, liegen im Bereich der Norm. Es ist daran zu denken, daß hier die Ausscheidung von Tetrahydroaldosteron erhöht sein könnte, was mit unserer Methode nicht zu erfassen ist. Auf diese Möglichkeit einer erhöhten Ausscheidung von Aldosteronmetaboliten beim Conn-Syndrom hat schon NEHER (23) aufmerksam gemacht.

Diskussion

Das jetzt von uns beschriebene Verfahren zur Bestimmung des Aldosterons im Harn zeichnet sich dadurch aus, daß der Harnextrakt nach säulenchromatographischer Vorreinigung durch nur *eine* zweidimensionale Dünnschichtchromatographie getrennt wird. Das bedeutet gegenüber anderen Verfahren einen erheblichen Zeitgewinn.

Das nach der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie isolierte Aldosteron ist weitgehend rein, wie die zweidimensionale Rechromatographie mit anderen Lösungsmittelsystemen und der Vergleich mit authentischem Aldosteron zeigte. Auch die Fluoreszenz- und Absorptionsspektren der Schwefelsäurechromogene von

dem aus Harn isolierten Aldosteron sind identisch mit den Spektren von reinem Aldosteron. Die Spezifität unserer Methode beruht auf der Kombination einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie mit der für Δ^4 -3-Ketosteroide spezifischen Fluoreszenz auf einer Lithiumhydroxyd-Oberfläche.

Das Verfahren liefert gute Resultate. Das erkennt man, wenn man die nach unserer Methode ermittelten Normalwerte mit denen anderer Autoren vergleicht. Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, liegt das Mittel der Normalwerte bei uns um ein Geringes höher als die der meisten anderen Autoren. Allerdings sind auch die Wiederfindungen bei diesen Methoden meistens geringer als bei unserer Methode. Dagegen stimmen unser Mittelwert und die Schwankungsbreite gut mit denen, die mit der Isotopenverdünnungsmethode (7) gefunden wurden, überein.

Da die Methode spezifisch und genügend genau ist, dabei nur $\frac{1}{10}$ Volumen des Tagesharns benötigt und außerdem methodisch weniger aufwendig ist, als die bisher beschriebenen, glauben wir, daß sie sich als Routinemethode eignet.

Wir danken Fräulein MARGOT BINGEL für geschickte Mitarbeit. Herrn Dr. R. NEHER, Fa. CIBA AG. Basel/Schweiz, danken wir für die freundlich überlassene Probe Aldosteron.

Der *Alexander-von-Humboldt-Stiftung* dankt der eine von uns — EDGAR NOWOTNY — für ein Stipendium; dem „Fonds der Chemie“ danken wir für Unterstützung der Arbeiten.

Literatur

1. NEHER, R. und A. WETTSTEIN, *Acta endocr. K'hvn* 18, 386 (1955). — 2. NEHER, R. und A. WETTSTEIN, *J. Clin. Invest.* 35, 800 (1956). — 3. MOOLENAAR, A. J., *Acta endocr., K'hvn* 25, 161 (1957). — 4. AYRES, P. J., O. GARROD, S. A. SIMPSON und J. F. TAIT, *Biochem. J.* 65, 639 (1957). — 5. NOVACZYNSKI, W. J., R. P. STEYERMARK, E. KOIW, J. GENEST und R. N. JONES, *Canad. J. Biochem. Physiol.* 34, 1923 (1956). — 6. NOVACZYNSKI, W. J., E. E. KOIW und J. GENEST, *Canad. J. Biochem. Physiol.* 35, 425 (1957). — 7. KLIMAN, B. und R. E. PETERSON, *J. biol. Chemistry* 235, 1639 (1960). — 8. STAIB, M. C., J. F. DINGMAN und K. W. FESTER, *J. Clin. Endocr., Springfield* 21, 148 (1961). — 9. SIEGENTHALER, W. E., A. DOWDY und J. A. LUETSCHER, *J. Clin. Endocr., Springfield* 22, 172 (1962). — 10. HERNANDO, L., J. CRABBÉ, E. J. ROSS, W. J. REDDY, A. E. RENOLD, D. H. NELSON und G. W. THORN, *Metabolism*, Baltimore 6, 518 (1957). — 11. BAULIEU, E. E. und M. DE VIGAN, *Rev. franç. Études clin. biol.* 3, 71 (1958). — 12. ROMANI, J. D., *Presse méd., (Paris)* 66, 837 (1958). — 13. DYRENFURTH, I. und E. H. VENNING, *Endocrinology* 64, 648 (1959). — 14.

BROCKS, R. V., *Mem. Soc. Endocr.* 8, 9 (1960). — 15. BROMBACHER, P. J. und M. C. HARTING, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 6, 886 (1961). — 16. GERDES, H. und W. STAIB, *Klin. Wschr.* 43, 789 (1965). — 17. NISHIKAZE, O. und H. J. STAUDINGER, *Klin. Wschr.* 40, 1014 (1962). — 18. NOWOTNY, E., R. ABRAHAM und H. J. STAUDINGER, *diese Z.* 3, 8 (1965). — 19. ABRAHAM, R. und H. J. STAUDINGER, *Z. Naturforsch.* 18 b, 421 (1963). — 20. ABRAHAM, R. und H. J. STAUDINGER, *diese Z.* 2, 16 (1964). — 21. STARK, G., zit. in: Aldosteron, 9. Symposium der Dtsch. Ges. f. Endokrinologie. Wiesbaden, Mainz, 3.—5. Mai 1962, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963). — 22. SIMS, E. A. H., C. I. MEEKER, M. J. GRAY, M. WATANABE und S. SOLOMON, zit. in: Aldosteron A Symposium Organized by the Council for Internat. Organiz. of Med. Sc., established under the Joint Auspices of UNESCO & WHO., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1964). — 23. NEHER, R., zit. in: Aldosteron, S. 24, Tab. 2. 9. Symposium der Dtsch. Ges. f. Endokrinologie. Wiesbaden, Mainz 3.—5. Mai 1962, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963).

Professor Dr. H. J. Staudinger
63 Gießen,
Friedrichstr. 24